

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE - N° 168

Travail des Laboratoires de Chimie organique et de Matière Médicale
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

Contribution à l'étude
de la constitution chimique du ferment
saponifiant-synthétisant de la graine de ricin

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 2 Février 1932

PAR

Jean DELORME

Pharmacien

Licencié ès Sciences

Ex-Interne en Pharmacie

Lauréat des Hôpitaux de Lyon

Ex-Préparateur à l'Institut Bactériologique de Lyon

Né le 8 Septembre 1907 à CHALON-sur-SAONE (Saône-et-Loire)



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

1932

CONTRIBUTION à l'ÉTUDE de la CONSTITUTION CHIMIQUE
du FERMENT SAPONIFIANT-SYNTHÉTISANT
de la GRAINE de RICIN

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE - N° 168

Travail des Laboratoires de Chimie organique et de Matière Médicale
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

Contribution à l'étude
de la constitution chimique du ferment
saponifiant-synthétisant de la graine de ricin

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 2 Février 1932

PAR

Jean DELORME

Pharmacien

Licencié ès Sciences

Ex-Interne en Pharmacie

Lauréat des Hôpitaux de Lyon

Ex-Préparateur à l'Institut Bactériologique de Lyon

Né le 8 Septembre 1907 à CHALON-sur-SAONE (Saône-et-Loire)



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

1932

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire	M. L. HUGOUNENQ
Doyen	M. J. LEPINE
Assesseur	M. ROLLET

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. CAZENEUVE, ROQUE, LANNOIS, HUGOUNENQ, ROCHET, BARRAL.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. PIC
Cliniques chirurgicales	PAVIOT
Clinique obstétricale et Accouchements	TIXIER
Clinique ophtalmologique	BERARD
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	VORON
Clinique neurologique et psychiatrique	ROLLET
Clinique des maladies des enfants	NICOLAS
Clinique des maladies des femmes	LEPINE (J.)
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURIQUAND
Clinique des maladies des voies urinaires	VILLARD
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie	COLLET
Clinique et prophylaxie de la tuberculose	GAYET
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie	NOVE-JOSSERAND
Chimie biologique et médicale	COURMONT
Chimie organique et Toxicologie	CLUZET
Matière médicale et Botanique	FLORENCE
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	MOREL
Anatomie	MANCEAU
Histologie	GUIART
Physiologie	LATARJET
Pathologie externe	POLICARD
Pathologie interne	DOYON
Pathologie et Thérapeutique générales	LERICHE
Anatomie pathologique	FROMENT
Chirurgie opératoire	CADE
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie	FAVRE
Médecine légale	PATEL
Hygiène	ARLOING (F.)
Thérapeutique	ETIENNE MARTIN
Pharmacie et Pharmacologie	ROCHAIX
Hydrologie thérapeutique et climatologie	SAVY
	LEULIER
	PIERY

PROFESSEUR TITULAIRE SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Propédeutique de gynécologie M. CONDAMIN

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Anatomie topographique	MM. THEVENOT (i éon)
Puériculture et hygiène de la première enfance	RHENTER
Chirurgie expérimentale	TAVERNIER
Applications du radium	NOGIER
Stomatologie	TELLIER

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
NOGIER	NOEL	ROCHET (Ph.)	CHAMBON
RHENTER	DUMAS	WERTHEIMER	CIBERT
MAZEL	DUFOURT	GATE	EPARVIER
SANTY	DEVIC	BERNHEIM	GUILLEMINE
CHALIER (André)	GABRIELLE	DECHAUME	MORENAS
CHALIER (Joseph)	MARTIN (Joseph)	POLLOSSON	REFATTU Ch...
			REVOL Ch...



EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. MOREL, président; LEULIER, assesseur;
MANCEAU, professeur et CHAMBON, agrégé

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

A MES MAITRES

MONSIEUR LE PROFESSEUR MOREL
Professeur de Chimie Organique et de Toxicologie
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR MANCEAU
Professeur de Matière Médicale et Botanique
Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui ont inspiré et dirigé ce travail.

A MES JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR LEULIER
Professeur de Pharmacie et de Pharmacologie
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ CHAMBON
Pharmacien-Chef de l'Hôtel-Dieu

A MES MAITRES
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
ET DES HÔPITAUX DE LYON

A MES CAMARADES D'INTERNAT

A MES AMIS

CONTRIBUTION à l'ÉTUDE de la CONSTITUTION CHIMIQUE
du FERMENT SAPONIFIANT-SYNTHÉTISANT
de la GRAINE de RICIN

Avant-Propos

En 1832, PAYEN et PERSOZ donnèrent le nom de diastase à la poudre grisâtre, soluble dans l'eau, qu'ils avaient retirée par précipitation à l'alcool d'une infusion de malt. Par ce terme ils attiraient l'attention sur la « curieuse propriété que possède ce produit de séparer les enveloppes des globules de fécule de leur matière intérieure ». DUBRUNFAUT (1823) et MITSCHERLICH (1826) avaient signalé le pouvoir hydrolysant de l'orge germé et de la levure.

Le terme de diastase a été étendu à tous les produits élaborés par la cellule vivante, capables de transformer un poids de substance considérable par rapport à leur propre poids. Cette disproportion entre la masse de l'agent causal et celle du corps hydrolysé constitue le caractère essentiel des diastases auxquelles on donne encore le nom d'enzymes, de ferments.

Le nombre des diastases n'a cessé de croître. De chaque principe fourni par la matière vivante on a voulu trouver l'enzyme hydrolysante. Il en est résulté

une liste imposante où un bon esprit pourrait reconnaître nombre de « phénoménines » dont parlait LE DANTEC. Mais dans ce domaine de la Chimie Biologique il est encore bien difficile d'échapper aux explications purement nominales.

Si la purification des enzymes a fait des progrès indéniables depuis un demi-siècle, en revanche, les travaux entrepris pour déceler la constitution des enzymes sont loin d'avoir donné les résultats attendus, ils ont toutefois permis l'élaboration d'ingénieuses hypothèses. En effet, même lorsque l'édifice protéique sous lequel se dérobe le ferment a été patiemment éliminé, même lorsque le produit obtenu ne donne plus les réactions des hydrates de carbone, des protides et des purines, le principe actif n'a pu être saisi.

Aux principaux constituants des êtres vivants glucides, protides et lipides correspondent des ferments capables de les hydrolyser. Ces trois catégories de ferments constituent le groupe très important et le mieux étudié des enzymes : les *hydrolases*, qui comprennent donc les *glucidases*, les *protéases* et les *estérases*.

De toutes les estérases, les *lipases*, nom donné par BOURQUELOT aux ferments des graisses, occupent la première place tant par les études théoriques qui en ont été faites que par le rôle qu'elles jouent dans les organismes.

On range dans le groupe des estérases quelques ferments qui s'attaquent à des éthers-sels particuliers, tels que les dérivés sulfo-conjugués des phénols ou à des éthers-sels appartenant à des molécules

organiques complexes, et qui sont sans rapport avec les lipases, telles que les sulfatases, les tannases, la chlorophyllase, etc... Il faut également remarquer que par lipase on désigne des enzymes qui n'ont de commun que leur pouvoir saponifiant, mais dont la substance réelle est foncièrement différente.

Parmi les « Phytoestérases » nous avons étudié la Lipase de la graine de Ricin, en limitant nos efforts à l'étude de la constitution chimique de ce ferment endocellulaire.

Avant d'entreprendre l'exposé de ce travail il nous est infiniment agréable d'exprimer à nos Maîtres notre très réelle reconnaissance.

M. le Professeur MOREL nous a fait le grand honneur de nous accepter comme préparateur dans son service de Chimie à l'Institut Bactériologique, où nous avons pu profiter d'un enseignement précieux. Il nous a donné le sujet de ce travail et chaque jour nous a guidé et aidé. Au contact de ce Maître nous avons acquis une discipline de travail et pu apprécier toute la délicatesse d'une bonté dont nous conservons un souvenir ému. Qu'il veuille bien nous considérer comme l'un de ses plus fidèles élèves et croire à notre inaltérable reconnaissance.

M. le Professeur MANCEAU fut au cours de nos études un conseiller bienveillant. Il nous a largement facilité ce travail. Ni ses conseils, ni son aide ne nous furent ménagés. Nous conservons de l'année passée en son Laboratoire un profond souvenir. Nous le prions de croire à notre reconnaissance infinie et à notre très respectueuse amitié.

M. le Professeur LEULIER, qui nous a souvent encouragé de ses conseils, nous fait le grand honneur d'être notre juge aujourd'hui. Nous lui exprimons notre très vive gratitude.

M. le Professeur Agrégé CHAMBON, Pharmacien Chef de l'Hôtel-Dieu, nous a donné au cours de notre internat maintes preuves de l'intérêt qu'il nous porte. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Introduction

Les travaux de CHEVREUIL (1823) (8) et de BERTHELOT (1854) (4) ont de très bonne heure apporté toutes les clartés nécessaires sur le mécanisme de l'hydrolyse des glycérides, effectuée par voie chimique. En revanche, le même phénomène biochimique représente une question encore obscure de la chimie physiologique.

Comme tout acte biologique, l'hydrolyse des glycérides dépend chez le végétal comme chez l'animal de l'action des ferments et en ce qui concerne les ferments lipolytiques végétaux il semble bien que le « phénomène biologique ne soit pas encore réduit à l'état de phénomène physico-chimique ».

On peut entrevoir la possibilité d'élucider la nature des « Zooestérases », celles-ci présentant les mêmes caractères de solubilité que la majorité des enzymes et pouvant être soumises aux méthodes modernes de purification des ferments par adsorption et élution (12) ou par cataphorèse (24). En revanche, les « Phytoestérases » et la lipase de la graine de Ricin en particulier ne présentent point cet avantage. Le ferment étant complètement enfermé dans le cytoplasme ainsi que l'a démontré NICLOUX (38), partant les méthodes si

élégantes des auteurs allemands (35) ne sont d'aucun secours. En fait, les tentatives pour séparer le ferment de son support protéique ont échoué (55).

Nous nous sommes proposé dans ce travail de rechercher s'il ne serait pas possible d'atteindre à travers le cytoplasme l'agent causal de l'acte fermentaire et d'en élucider la constitution.

Plan suivi dans ce travail

CHAPITRE PREMIER. — Historique des travaux relatifs au ferment saponifiant-synthétisant des graines de Ricin.

CHAPITRE II. — Etude critique des différentes méthodes de préparation du ferment.

A. — Préparation de la « lipaséidine », d'après NICLOUX.

B. — Préparation du ferment « activé », d'après A. MOREL et L. VELLUZ.

C. — Préparation de la « Ricinuslipase » ou « Crème de ferment », d'après WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ.

D. — Technique personnelle. Mesure de l'activité saponifiante-synthétisante du ferment obtenu.

CHAPITRE III. — Propriétés de la lipase de la graine de Ricin.

CHAPITRE IV. — Analyse du ferment « activé » et pur, préparé selon notre technique.

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE PREMIER

Historique

Les travaux biochimiques se rapportant à l'hydrolyse des glycérides chez les végétaux sont déjà anciens. PELOUZE (39), en 1855, signalait l'hydrolyse des corps gras des graines oléagineuses au contact des éléments de celles-ci. Un peu plus tard, MUNTZ (37) montrait que la première phase de l'utilisation de la matière grasse des graines par l'embryon coïncidait avec l'hydrolyse du corps gras et que l'acidité constatée provenait des acides gras des glycérides neutres. Les recherches de MAILLOT (33), en 1888, portèrent sur la graine de Ricin dont il parvint à extraire une poudre blanche, soluble (p) dans l'eau et dans l'alcool, douée de pouvoir hydrolytique. GREEN (17) faisait en 1890 dans son ouvrage, « On the germination of the seeds of the Castor Oil Plant (*Ricinus Communis*) » d'intéressantes remarques sur le rôle, au cours de la germination, d'une substance à pouvoir lipolytique, sans parvenir à l'isoler. SIGMUND (43), à la même époque,

confirmait ces remarques. En 1902, CONNSTEIN, HOYER et WARTENBERG (9), surtout préoccupés de buts industriels, attiraient l'attention sur le fait que la graine de Ricin en présence d'eau dédouble les corps gras en leurs constituants, à condition d'opérer en milieu acide. Ils signalaient également que l'hydrolyse est différente suivant les graines employées. A cet égard, les graines de Ricin surtout, et celles des Euphorbiacées sont très différentes par leur pouvoir lipolytique élevé des autres semences étudiées. Des ferments à action saponifiante ont été signalés dans la Noix de Coco (32), la Noix de Cola (34), l'Arachide (10), la graine de Lin (48), les Amandes (16), les Fèves de Soja (15), les graines de Chélidoine (6) et les graines de Soleil (*Helianthus annuus*) (49).

URBAIN, SAUGON et FEIGE (51) remarquèrent que l'hydrolyse est arrêtée par la mise en liberté d'acides gras et ce retard est d'autant plus accentué que leur poids moléculaire est plus faible. Cette remarque, confirmée par HOYER (23) fut infirmée par TAYLOR (47) qui parvint à hydrolyser la triacétine par le ferment de Ricin. ARMSTRONG et ORMEROD (2) comparèrent l'action des estérases végétales et des estérases animales sur diverses substances et purent hydrolyser des esters sulfonés acides du glycérol par action fermentative de la lipase du Ricin.

C'est à M. NICLOUX (38) que revient le mérite d'avoir localisé l'agent lipolytique et d'en avoir fait une étude vraiment scientifique. Après de nombreuses expériences, cet auteur a montré que l'action de la « lipaséidine » extraite des graines par un procédé original, a

tous les caractères des actions diastasiques, étant régie par la loi

$$K = \frac{I}{t} \log. \frac{a}{a - x}$$

exprimant la vitesse d'hydrolyse produite par les diastase. Les principales conclusions de M. NICLOUX sont les suivantes :

« La partie active de la graine est le cytoplasme, à l'exclusion de tous les autres éléments cellulaires (grains d'aleurone en particulier).

« Cette action du cytoplasme n'est pas due à une diastase, l'eau la détruit dès que le cytoplasme n'est plus protégé par l'huile.

« L'étude détaillée de la saponification montre que l'acidité absolue joue un rôle minimum, la qualité de l'acide un rôle important. »

TANAKA, dans une série de travaux (45), décrit un nouveau mode de préparation de la lipase analogue à celui de M. NICLOUX. Il confirma les remarques de URBAIN, PERRUCHON et LANÇON (50) en ce qui concerne l'action stimulante de la leucine, de l'asparagine et des autres produits de dégradation des protides.

De nombreux efforts furent tentés pour la réalisation de l'hydrolyse industrielle des corps gras au moyen de la lipase du Ricin, ainsi que le prouvent les travaux multiples concernant cette question, tels ceux de VISSER (52), EULER (11), SOMMERVILLE (44), LOEW (31), BERGZELLER (5), JALANDER (27), FALK et NELSON (35).

On peut obtenir la formation de glycérides en mettant en présence la lipase d'un mélange de glycérol

et d'acides gras. Ce pouvoir synthétisant du ferment de Ricin a suscité de nombreux travaux parmi lesquels on peut citer ceux de POTTEVIN (42), HANSIK (22), KASTLE et LOEWENHARDT (28), BRADLEY (7), TAYLOR (46), BOURNOT (6), ARMSTRONG et GOSNEY (1).

WELTER (53) ainsi qu'IWANOW (26) réalisèrent la synthèse de glycérides d'acides gras au moyen de la lipase du Ricin. KRAUSS (29) isola les termes intermédiaires mono et dioléine. Cet auteur opérait à 20° en laissant le ferment en contact prolongé avec le glycérol et les acides gras. Le mélange était agité cinq fois par jour, chaque agitation était d'une durée de deux minutes.

Les résultats de cet auteur sont rapportés dans le tableau suivant :

HYDROLYSE des ESTERS			SYNTHÈSE des ESTERS		
0,01 Lipase sèche.			0,01 Lipase sèche.		
I gr. Trioléine.			0,957 Acide oléique.		
I cmc acide acétique N			0,104 Glycérol anhydre.		
100			I cc. Acide acétique.		
Durée (jours)	NaOH N/10 cm ³	Huile hydrolysée %	Durée (jours)	NaOH N/10 cm ³	Acides combinés %
15	29,51	89,02	15	30,31	11,16
30	29,30	88,57	30	30,35	11,04

Enfin MM. A. MOREL et L. VELLUZ (36) ont montré que le pouvoir hydrolysant ainsi que le pouvoir synthétisant du ferment de la graine de Ricin avait pour même support le cytoplasme de la graine. Ces auteurs ont également précisé les conditions d'obtention d'un ferment « activé » capable d'hydrolyser et de faire la réaction inverse, sans addition d'acide.

En 1924, WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ (54) publièrent un très important mémoire où ils passèrent en revue les modes d'obtention de la lipase ainsi que les tentatives pour dégager le ferment de son support protéique. Si cette énorme publication est remplie d'intéressantes remarques ayant trait aux transformations du ferment au sein de la graine, au cours de la germination, elle n'apporte pas d'éléments nouveaux au problème de la constitution du ferment.

Les auteurs sont unanimes à attribuer à la lipase du Ricin une action lipolytique très supérieure à celle des autres « Phytoestérases ». Comme celles-ci, la lipase du Ricin jouit d'une activité maxima en milieu acide à l'inverse des « Zooestérases ». La lipase des bactéries échappe pourtant à cette règle, son optimum d'action se trouve en zone neutre ou alcaline. La lipase du Ricin apparaît comme un ferment endocellulaire dont l'activité est étroitement liée au support colloïdal de nature protéique, aussi a-t-on pu se demander si le support n'était pas le ferment lui-même. C'est à cette conclusion que semblent aboutir WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ. C'est là encore une explication toute verbale. Il y a fort longtemps que l'on a attribué à l'élément colloïdal un rôle notable dans l'acte fermentaire. Bien des fois on a tenté de reproduire au moyen de métaux colloïdaux l'action des enzymes, mais on a abouti à un échec. Accorder aux propriétés individuelles du substratum organique un rôle de premier plan, en invoquant la grosseur des micelles, qui est en relation avec la réaction du milieu, leur signe électrique, ce n'est pas expliquer le phé-

nomène. La lipase du Ricin manifeste, en effet, avec une égale intensité, son action hydrolysante, sous des pH très différents, ainsi que le prouvent les observations faites par les auteurs allemands sur les variations du pH de la graine au cours de la germination.

Mais à côté de cet état colloïdal très particulier, ne pourrait-on pas rattacher l'action lipolytique de la lipase du Ricin à un autre élément ?

Avant d'aborder ce problème il nous a fallu préparer un ferment extrêmement pur, susceptible d'être soumis à des investigations chimiques.

L'étude critique des différents modes de préparation et la technique employée font l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE II

Etude critique des différentes méthodes de préparation du ferment Technique personnelle

Les graines de Ricin que nous avons employées au cours de notre travail renfermaient :

- 48 % d'huile,
- 26 à 27 % de téguments,
- 22 à 23 % de tourteaux,

composition voisine de celle qu'ont trouvé CONNSTEIN, HOYER et WARTENBERG :

- 47,51 % d'huile,
- 28 % de téguments,
- 21 à 25 % de tourteaux.

WILSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ donnent les chiffres suivants :

- 47 % d'huile,
- 28 % de téguments,
- 25 % de tourteaux.

Les graines employées par nous étaient des graines de l'année fournies par la firme GARBIT (1), de Marseille. Nous les avons conservées dans une atmosphère privée d'humidité. Cette précaution est indispensable si l'on veut éviter une diminution rapide de l'activité fermentaire. Cette remarque vient d'être confirmée par les observations de M. GUILLEMET (19).

Avant d'exposer notre procédé de préparation du cytoplasme nous allons faire l'inventaire des différentes techniques préconisées par les auteurs.

Préparation de la lipaséidine de Nicloux

C'est M. NICLOUX, qui, le premier, a donné un procédé permettant d'isoler le cytoplasme de la graine de Ricin des autres éléments cellulaires. Il est parvenu à éliminer une grande partie des grains d'aleurone.

Voici sa technique (Th. Doc. Sc., p. 16) :

« La graine de Ricin, de préférence décortiquée, est
« broyée ; on ajoute à la masse de l'huile de ricin ou
« mieux de l'huile de coton plus fluide, ce qui facilite
« les manipulations. Le mélange rendu bien homo-
« gène est filtré d'abord sur un tissu à mailles lâches
« puis sur une toile fine.

« A cette première opération correspond déjà une
« séparation grossière ; sur le tissu se trouve, en effet,
« réunie la plus grande partie des téguments, des

(1) Nous tenons à remercier M. GARBIT, Docteur en Pharmacie, Directeur des Etablissements A. GARBIT, 150, rue Saint-Pierre, à Marseille, qui a considérablement facilité notre tâche en nous procurant les graines de Ricin nécessaires à notre étude.

« parois cellulairés, des grains d'aleurone et une certaine quantité de cytoplasme avec les noyaux.

« L'huile filtrée qui s'écoule est trouble, elle contient en suspension un mélange de grains d'aleurone et de cytoplasme avec quelques fins débris de membranes cellulaires.

« Reste à séparer ces composants de la cellule. Voici une méthode qui permet d'atteindre ce but :

« On centrifuge l'huile additionnée ou non d'un dissolvant dans un appareil à grande puissance, et l'on obtient dans le tube du centrifugeur, après un certain temps variable avec la fluidité du mélange et la vitesse de l'appareil, deux couches bien distinctes. L'examen microscopique de celles-ci permet de faire la constatation suivante : la couche inférieure blanchâtre est constituée par les grains d'aleurone accompagnés par quelques débris de membranes cellulaires ; la couche supérieure grisâtre n'en renferme plus ou à peu près, la vitesse de l'appareil ayant eu pour effet de réunir au fond du tube les grains d'aleurone petits et gros. Cette couche supérieure est alors presque uniquement constituée par le cytoplasme, un certain nombre de noyaux fort petits dans le cas actuel et quelques-uns des grains d'aleurone ayant pu échapper à la filtration et à la centrifugation.

« On peut débarrasser le cytoplasme ainsi préparé de l'huile qu'il contient encore en forte proportion, en ayant recours à un solvant ; en centrifugeant à nouveau on l'obtient à l'état sec. »

M. NICLOUX signale que « ...cette souche supérieure

« est alors presque uniquement constituée par le cyto-
« plasmе, un certain nombre de noyaux fort petits
« dans le cas actuel et quelques-uns des grains d'aleurone ayant pu échapper à la filtration et à la centrifugation. »

Nous avons nous-même constaté qu'en suivant très exactement la technique citée, on obtient un produit encore souillé par les grains d'aleurone dont il faut se débarrasser avant d'entreprendre une étude chimique du cytoplasme.

Les auteurs allemands, s'inspirant des travaux de M. NICLOUX, ont également isolé le cytoplasme en suivant une technique analogue.

Les semences décortiquées sont dégraissées soit par expression à froid, soit par un solvant, chloroforme ou tétrachlorure de carbone (FALK et NELSON). HALEY et LYMAN (21) ont eu recours à l'éther de pétrole bouillant à basse température. HOYER (24) a obtenu des préparations de concentration enzymatique élevée par emploi de solvants de densités différentes. JALANDER a repris les directives de M. NICLOUX et obtenu un produit semblable.

En 1910, TANAKA a montré que l'on pouvait obtenir un ferment activé d'emblée en faisant digérer les graines de Ricin par une quantité convenable d'acide acétique dilué, puis en les lavant à l'eau pour entraîner les matières solubles et en séchant ensuite.

ARMSTRONG et GOSNEY ont légèrement modifié la technique de TANAKA. Les graines, décortiquées et broyées, sont dégraissées par deux digestions successives dans l'éther de pétrole et une dernière digestion

dans l'éther ordinaire. Le résidu pulvérisé est mélangé au mortier avec de l'acide acétique décinormal. Après 15 minutes de contact, le liquide est filtré et le résidu lavé plusieurs fois à l'eau est desséché incomplètement dans le vide, puis pulvérisé et tamisé. Neuf parties de graines donnent ainsi une partie de ferment qui saponifie en 20 heures à 30°, 10 parties d'huile dans la proportion de 90 p. 100, sans addition préalable d'acide, simplement en présence d'un excès d'eau. ARMSTRONG et GOSNEY ont mis en évidence le pouvoir synthétisant du ferment ainsi obtenu, en le mettant en contact avec un mélange de glycérol anhydre et d'acide gras de l'huile d'olive.

***Préparation de la Lipase activée
de MM. A. Morel et L. Velluz***

MM. A. MOREL et L. VELLUZ, reprenant les travaux de TANAKA, ARMSTRONG et GOSNEY, ont décrit une préparation de lipase activée. Le pouvoir du produit obtenu d'après la technique de ces auteurs est remarquable à la fois par son pouvoir saponifiant élevé et son pouvoir synthétisant. Les deux phénomènes se produisent sans addition d'acide. La technique suivie est la suivante :

« *Technique.* — Les graines décortiquées et fine-
« ment broyées, au moment même de leur emploi,
« sont intimement mélangées avec de l'huile d'olive,
« en proportions déterminées. On mélange 70 gr. de
« graines et 200 gr. d'huile. Puis on centrifuge à une
« vitesse de 3.000 tours environ et on décante soi-

« gneusement la couche supérieure renfermant le
« cytoplasme en suspension dans l'huile. On filtre à
« la trompe cette fine suspension, jusqu'à ce qu'on
« ait recueilli 160 gr. d'huile. On conserve la masse
« qui reste sur l'essoreuse et qui représente environ
« 10 gr. de cytoplasme et 20 gr. d'huile.

« Cette masse détachée est additionnée de 80 cm³
« d'acide acétique décinormal et on laisse en contact
« pendant une heure à l'étuve à 37° ou plus simple-
« ment à la température du laboratoire le mélange
« dont on a eu soin de réaliser l'homogénéité parfaite.

« On essore complètement à l'aide d'une trompe
« et le résidu est traité à nouveau par 120 cm³ d'eau
« distillée. On essore une deuxième fois à fond et très
« rapidement, puis la masse est dégraissée par l'éther
« ordinaire et centrifugée ; le résidu mis rapidement
« dans une cloche à vide, où l'on ne laisse plus que
« quelques millimètres de pression, en présence d'aci-
« de sulfurique. On a soin d'éviter autant que possible
« une exposition prolongée à la lumière. Le résidu
« sec de coloration grisâtre est finement pulvérisé
« au mortier d'agate et conservé dans le vide et à
« l'obscurité. On obtient 4 gr. 60 environ de ferment
« pour les 70 gr. de graines décortiquées mises en
« œuvre, soit 6,50 %.

« On peut modifier cette technique en isolant dès
« le début le cytoplasme de sa suspension huileuse
« de l'éther de pétrole et l'éther ordinaire et en cen-
« trifugeant, suivant la méthode d'isolement de NI-
« CLOUX, puis en desséchant le produit dans le vide.
« On le conserve ainsi à l'abri de l'humidité et de la

« lumière et on l'active plus tard, en mettant 10 gr.
« en suspension dans 20 gr. d'huile d'olive et en
« homogénéisant ce mélange avec 80 cm³ d'acide
« acétique décinormal, puis en terminant la prépa-
« ration comme précédemment. Les résultats sont les
« mêmes. »

L'étude comparative de ces différentes méthodes de préparation du cytoplasme nous a permis de faire les remarques suivantes :

Les techniques qui ont recours à des solvants tels que le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, le sulfure de carbone, l'acétone, fournissent des produits peu ou pas du tout actifs. Les pertes d'activité sont de l'ordre de 50 %, voire de 65 %, ainsi que nous avons pu le constater.

Pour ce qui est de l'acétone nos essais sont en désaccord avec ceux de WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ, qui écrivent dans leur mémoire paru en 1924 : « ...Ces essais — dégraissage à l'acétone — nous ont montré que l'acétone n'avait pas d'action nuisible. »

Ces résultats discordants proviennent sans doute de temps de contact différents entre le dissolvant et les graines. Nous avons, en effet, constaté que le temps de contact a une importance extrême. Certaines de nos préparations ont été dépourvues de toute activité par suite d'un contact trop prolongé.

Nous avons remarqué, en accord avec les auteurs allemands, que la glycérine et le glycol diminuaient le pouvoir saponifiant de la lipase. L'alcool éthylique a une action nocive manifeste.

Deux dissolvants nous ont paru particulièrement

indiqués pour le dégraissage des graines et de la lipase. Ce sont l'éther de pétrole et l'éther éthylique. On peut admettre que ces deux dissolvants possèdent une action moins brutale sur le substratum colloïdal du ferment. Il faut toutefois remarquer que ces solvants par un contact prolongé, ont une action destructive aussi marquée que les autres.

Quant à l'action de l'eau et des réactifs aqueux sur la lipase, les conclusions des auteurs sont contradictoires. Pour M. NICLOUX, en accord avec HOYER, l'eau détruit ou affaiblit dans de notables proportions l'action hydrolysante du ferment. HALEY et LYMAN ont fait la même observation. TANAKA, ARMSTRONG et GOSNEY, MM. A. MOREL et L. VELLUZ obtiennent un produit actif en traitant le ferment par l'eau acidulée par l'acide acétique.

Ces contradictions s'expliquent à notre avis par le fait que l'on compare des produits très différents. D'autre part, les détails les plus minimes d'une technique ont une importance capitale : temps de contact entre les graines et un dissolvant ou un réactif aqueux, degré de dessiccation, etc...

D'après les nombreuses préparations et observations que nous avons pu faire, on peut dire que le ferment rigoureusement privé de tout corps gras est extrêmement sensible aux réactifs aqueux, à l'humidité atmosphérique, à la lumière. Sous cet état physique, il supporte sans perte d'activité l'action de l'éther de pétrole et de l'éther éthylique, à condition que le temps de contact soit extrêmement court.

Partiellement dégraissé, ou mis en suspension dans

l'huile, un traitement même prolongé par les réactifs aqueux est sans action sur son pouvoir hydrolysant.

On peut d'ailleurs supposer que dans le cas de l'activation par l'acide acétique le support colloïdal de l'enzyme prend une certaine charge qui lui confère une résistance vis-à-vis de l'eau.

D'après WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ, l'état colloïdal jouerait un grand rôle dans l'activité du ferment. Constatant l'extrême influence des solvants et des réactifs aqueux sur le pouvoir saponifiant, ils se sont demandés si pendant le dégraissage ces solvants « n'agissaient pas sur la dispersion et l'état colloïdal de son support ».

Partant de cette hypothèse discutable, ils ont songé à protéger la lipase, au cours du dégraissage, en la mélangeant au Kieselgur, employé comme agent de dilution et non comme adsorbant.

Préparation de la Kieselgur lipase

Dans ce but ils ont donné la technique suivante :

TECHNIQUE. — « 1 kilo de graines de Ricin décortiquées sont broyées en présence de 14 kilos d'eau. L'émulsion ainsi obtenue est centrifugée à 3.000 tours. Cette crème, dont le pouvoir lipasique serait diminué par dégraissage ou dessiccation, est mélangée à 333 gr. de Terre d'Infusoires (Kieselgur). On obtient une pâte

que l'on peut soit dégraisser et dessécher en une seule opération par traitement à l'acétone et à l'alcool, soit dessécher à l'étuve, puis dégraisser par un solvant neutre dans un appareil à extraction.

0 gr. 2944 de lipase adsorbée sur Kieselgur, correspondant à 1 gr. de graines de ricin décortiquées, mis en présence de 2 gr. 50 d'huile et de 2 gr. d'eau à une température de 20° et en 20 minutes saponifient 18 % d'huile. »

Cette technique ne présente qu'un intérêt très relatif. Le produit obtenu est impur, souillé de Kieselgur et faiblement actif. Nous avons fait trois préparations de « Kieselgurlipase » et nous avons constaté que l'activité était très inférieure à celle annoncée par les auteurs. Cela tient sans doute à la rédaction volontairement obscure de la technique qui a fait l'objet d'un brevet, en vue d'applications industrielles possibles.

Ces auteurs semblent d'ailleurs accorder leur préférence à la méthode suivante, dans laquelle on n'a pas recours au Kieselgur. Voici cette technique telle qu'elle est exposée dans *Oppenheimer* (Article « Lipasen den Samen », Edition 1929). Il est à noter que dans tout l'article consacré à la lipase dans cet ouvrage il n'est pas question de la technique au Kieselgur. Faut-il voir là une preuve des mauvais rendements obtenus en employant la méthode préconisée dans le mémoire de WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ (1924) ?

Préparation de la crème de ferment (Ricinulipase)

TECHNIQUE. — « 20 grammes de graines de Ricin décortiquées renfermant 150 unités Phytolipase E. (1) sont broyées dans un mortier jusqu'à obtention d'une pâte visqueuse. Cette pâte est intimement mêlée avec 140 cm³ d'eau, ajoutée par fractions de 15 cm³. Le lait ainsi formé est centrifugé 15 minutes à 3.000 tours. Il se forme trois couches : une couche supérieure constituée par une crème assez épaisse, au fond du tube un dépôt solide, entre ces deux couches une solution presque claire.

Après séparation de la crème et élimination de la solution aqueuse, on reprend le culot inférieur avec environ 140 cm³ d'eau que l'on mêle intimement. On centrifuge, on obtient ainsi une petite quantité de crème que l'on ajoute à celle précédemment obtenue.

La crème contient 90 % de la lipase.

Le culot contient 7 % de la lipase. »

La sensibilité extraordinaire de la lipase de Ricin

(1) WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ donnent la définition suivante de cette unité :

« L'unité Ph. L. E. (Phytolipase einheit) est la quantité
« d'enzyme, qui, dans les conditions du titrage, à 20°, pour
« un Ph. de 4,7, réalisé par un tampon acétique de 2 cm³
« (1 cm³ d'acétate d'ammoniaque demi normal + 1 cm³
« d'acide acétique deminormal), saponifie 2 gr. 50 d'huile
« d'olive, d'indice de saponification 185,5 dans la propor-
« tion de 7,5 %. »

« Si la saponification dépasse 45 % la méthode de mesures
« est inapplicable. »

est une difficulté pour obtenir un produit sec sans nuire à son activité. Parmi les nombreux procédés essayés par WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ, celui qui semble préférable consiste à dessécher la crème à l'air jusqu'à une perte de poids de 30 %. La dessiccation à poids constant altère l'enzyme. Cette dessiccation s'opère de la façon suivante :

« La crème est étendue en couche mince et soumise à un courant d'air tiède. Même privée partiellement d'eau, l'enzyme est très sensible à l'action des solvants des graisses. Le meilleur procédé de dégraissage consiste à placer la crème sous une cloche remplie de vapeurs d'éther pendant 36 heures. C'est alors qu'on fait agir l'éther directement.

15 grammes d'une crème à teneur de 106 unités Ph.L.E. sont étendus sur une plaque de verre et séchés pendant deux heures dans un courant d'air rapide à 36°.

10 grammes de crème desséchée, placés dans une capsule, sont mis sous une cloche de verre pendant 36 heures au-dessus d'une couche d'éther. L'enzyme est ensuite délayée dans 100 cm³ d'éther. On centrifuge. L'enzyme est lavée trois fois dans le tube à centrifuger avec chaque fois 30 cm³ d'éther et séchée dans un dessiccateur.

L'enzyme obtenue pèse 0 gr. 60 et contient 7 unités Ph L. E., correspondant à 71 % de l'activité de la crème sèche. La concentration de la lipase est donc 16 fois celle des graines décortiquées. »

Nous avons également contrôlé cette méthode qui donne de bons résultats. Mais on doit signaler que

si le produit obtenu est actif, il n'atteint pas le degré de pureté de la « lipaséidine » de M. NICLOUX.

Afin d'obtenir un produit très pur absolument exempt de grains d'aleurone et susceptible d'être soumis à des investigations chimiques, nous avons adopté la technique suivante :

Technique personnelle

A. — EXTRACTION DU CYTOPLASME. — 20 grammes de graines de Ricin, soigneusement décortiquées, sont broyées au mortier en consistance de pâte très fine. Cette pâte est délayée avec 80 cm³ d'acétate d'éthyle (D=0,873), ajouté par fractions de 20 cm³. On obtient une émulsion laiteuse qui est centrifugée aussitôt dans un centrifugeur tournant à 3.000 tours. Le culot de centrifugation présente deux couches distinctes : la couche inférieure est constituée par les débris de membranes cellulaires, la couche supérieure blanche par les grains d'aleurone et les noyaux des cellules.

Les liquides de centrifugation d'apparence laiteuse sont réunis dans un ballon à long col, et dont le bouchon laisse passer deux tubes d'inégale longueur. Ce ballon est retourné et au bout de quelques instants une sédimentation s'opère. Les couches inférieures contenant le cytoplasme sont réparties au moyen du petit tube dans des tubes de centrifugeur. Le grand tube permet la rentrée d'air à la partie supérieure du ballon sans qu'il y ait une agitation au sein du liquide, qui remettrait le cytoplasme en suspension. De cette façon les liquides centrifugés sont beaucoup plus ri-

ches en cytoplasme et la centrifugation se trouve de ce fait considérablement diminuée. Détail qui a son importance, car on ne peut laisser impunément le ferment en contact prolongé avec l'éther acétique. Après centrifugation du liquide ainsi prélevé, le cytoplasme rassemblé au fond du tube est détaché et mis dans une cloche à vide au-dessus de l'acide sulfurique et à l'abri de la lumière. (L'éther acétique provenant d'une opération peut être récupéré par distillation dans le vide.)

Ce cytoplasme est absolument exempt de grains d'aleurone ainsi que nous l'ont prouvé de nombreux examens microscopiques.

B. — ACTIVATION DU CYTOPLASME. — Le cytoplasme qui a subi un traitement à l'éther acétique retient encore sur sa surface une couche de corps gras. Il faut un épuisement prolongé par l'éther de pétrole pour parvenir à éliminer les corps gras qui imprègnent le ferment.

Bien que ce ferment retienne encore une certaine quantité d'huile sur sa surface, nous lui incorporons environ $1/10^e$ de son poids d'huile d'olive avant de l'activer. Si l'on ne pratique point ce traitement préalable, on diminue l'activité saponifiante du ferment.

Pour l'activation du ferment nous suivons, aux détails près, la technique de MM. A. MOREL et L. VELLUZ.

Après traitement par l'huile, le cytoplasme est additionné de 50 cm^3 d'acide acétique décinormal. On laisse en contact 20 minutes à 37° , en agitant conti-

nuellement. Après filtration sur filtre en verre poreux d'Iéna, le produit est remis par deux fois en suspension dans 10 cm³ d'eau distillée. On essore enfin très complètement. La masse détachée est mélangée à 125 cm³ d'éther. On centrifuge et le culot de centrifugation est rapidement placé dans le vide sulfurique et à l'aide de la lumière. 100 gr. de graines ainsi traitées fournissent environ 1 gr. de ferment pur.

La dessiccation du produit doit être surveillée. On doit l'arrêter dès que le produit a pris un aspect blanchâtre. Une dessiccation plus poussée donne un produit d'aspect corné ou en paillettes, qu'il est très difficile de remettre en suspension dans un mélange huile + eau, partant le produit perd une grande partie de son pouvoir hydrolysant.

Dans l'extraction du cytoplasme, l'acétate d'éthyle offre l'avantage sur l'huile (procédé NICLOUX) de permettre l'élimination totale des graines d'aleurone par différence de densité, tout en maintenant en suspension le cytoplasme. De plus, contrairement aux autres dissolvants organiques, l'acétate d'éthyle respecte l'intégrité du cytoplasme, qui conserve ses propriétés lipolytiques.

Le ferment obtenu est extrêmement hygroscopique. En quelques instants, de pulvérulent qu'il était, il devient compact, dès qu'il est extrait de la cloche à vide. Des pesées successives du ferment desséché et mis au contact de l'air humide, nous ont montré qu'il fixait l'humidité avec une vitesse légèrement supérieure au chlorure de calcium desséché et pesé dans

les mêmes conditions. Cette hydrophilie expliquerait peut-être le pouvoir synthétisant du ferment qui fixant l'eau déplacerait l'équilibre du système :

glycérol + acides gras $\rightleftharpoons$ glycérides + H₂O
dans le sens de la formation de glycérides ?

Mesure de l'activité du ferment préparé d'après notre technique

Pour évaluer le pouvoir hydrolysant du ferment, nous l'avons fait agir sur un mélange contenant 2 gr. 50 d'huile d'olive, mesurés au moyen d'une pipette jaugée pour cet usage, d'indice de saponification 207, et 2 cm³ d'acide acétique décinormal (pH = 2,8 — 3). Si l'on opère avec le ferment activé, les 2 cm³ du mélange ci-dessus sont remplacés par 2 cm³ d'eau distillée.

Dans un ballon rond de 50 cm³, on introduit successivement le ferment, le réactif aqueux — on agite pour disperser le ferment — puis l'huile. Le ballon, bouché, est fixé sur un axe horizontal tournant dans une étuve réglée à 37°.

Les acidités initiales et finales sont appréciées au moyen de la potasse normale.

EXEMPLE. — On introduit dans le ballon :

Lipase pure activée.....	0 gr. 05
Huile	2 gr. 50
Eau distillée.....	2 gr.

On soumet à une agitation continue dans l'étuve réglée à 37°.

Pour saturer l'acidité libérée il a fallu 4 cm³ 50 de potasse normale.

Le pourcentage de glycérides hydrolysés est donné par la formule suivante :

$$\frac{4,5 \cdot 56,1 \cdot 100}{2,5 \cdot 207} = 48,78 \%$$

I. — POUVOIR SAPONIFIANT DU CYTOPLASME PUR, NON ACTIVÉ :

Poids du ferment	Temps d'hydrolyse	Pourcentage de glycérides hydrolysés
0 gr. 10	30 min.	46,06
0 gr. 20	30 —	50,95
0 gr. 25	50 —	65,30

II. — POUVOIR SAPONIFIANT DU CYTOPLASME PUR ACTIVÉ :

Poids du ferment	Temps d'hydrolyse	Pourcentage de glycérides hydrolysés
0 gr. 05	30 min.	54,20
—	—	42,80
—	—	48,78
—	—	52,05
—	—	45,10
—	—	42,50
—	—	51,10

Mesure du pouvoir synthétisant du cytoplasme pur active

Pour évaluer le pouvoir synthétisant du cytoplasme activé, on a mis celui-ci en présence d'un mélange de glycérol anhydre et d'acides gras, lequel a été placé dans un ballon rond de 50 cm³, fixé sur un axe horizontal tournant dans une étuve réglée à 37°.

Les acides gras ont été obtenus par saponification de l'huile d'olive chauffée au réfrigérant à reflux avec de la potasse alcoolique pendant 6 heures. Cette solution est étendue de 10 fois son volume d'eau distillée et acidifiée par l'acide chlorhydrique pur. On laisse au repos dans une boule à décantation. Les acides gras, séparés, sont lavés jusqu'à ce que les eaux de lavage ne donnent plus de trouble par le nitrate d'argent.

Le glycérol anhydre a été obtenu en traitant le produit officinal par du sulfate de soude pur anhydre. Le sulfate de soude est soigneusement mêlé au glycérol et soumis à une agitation de deux heures. Le produit obtenu est conservé à l'abri de l'humidité atmosphérique.

On a apprécié les acidités finales et initiales en cm³ de potasse décijnormale.

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

Poids du ferment	Temps	Acidité initiale	Acidité finale	Pourcentage d'acides gras combinés
0 gr. 05	1 h.	25,40	22,10	12,99
—	1 h. 30	25,40	21,10	14,56
—	2 h.	25,40	20,10	23,54
—	2 h. 30	25,40	19,05	25

La mesure du pouvoir saponifiant synthétisant du produit préparé selon notre technique nous a donc montré que nous étions en possession d'un ferment dont l'activité était égale et même supérieure aux produits préparés selon d'autres procédés, de plus notre ferment présentait le maximum de pureté.

Avant d'exposer nos tentatives pour déceler la constitution chimique du ferment, nous allons passer en revue les principales propriétés de lipase.

CHAPITRE III

Propriétés de la lipase de la graine de ricin

Le ferment activé se présente sous l'aspect d'une poudre blanche extrêmement hygroscopique. Insoluble dans l'eau, il communique à celle-ci une réaction acide ($\text{pH}=5,2$). Il donne au contact de l'eau une mousse abondante.

En présence d'huile et d'eau, le ferment activé donne une émulsion instantanée et très stable.

Le produit parfaitement dégraissé s'altère très vite au contact de l'eau, qui modifie sans doute profondément l'état de dispersion du substratum protéique. Exposé à la lumière, il perd une grande partie de son activité.

La dessiccation de la lipase doit être conduite avec prudence. Un produit sec est dénué de toute activité. Cette disparition du pouvoir saponifiant est due sans doute à une transformation profonde de l'état colloïdal, qui serait modifié par une déshydratation éner-

gique. Il est curieux de noter qu'il semble exister un optimum d'hydratation en dehors duquel la lipase est inapte à tout acte fermentaire.

La destruction de la lipase est encore plus rapide si le milieu est tant soit peu alcalin.

Nous avons déjà signalé l'action nuisible des alcools éthylique et méthylique, du chloroforme, de l'aldéhyde formique. WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ prétendent que seuls les mélanges suivants peuvent être employés sans dommage : le tétrachlorure de carbone, l'éther, l'alcool-éther, le tétrachlorure-acétone-éther et l'acétone. Nous sommes en désaccord avec ces auteurs en ce qui concerne l'alcool et l'acétone. Le glycérol, bien que se formant au cours de la saponification, détruit la lipase de la graine de Ricin. Ce même corps est sans action sur les lipases hépatique et pancréatique. Exemple des différences profondes qui séparent des enzymes d'activité identique mais foncièrement dissemblables quant à leurs propriétés physiques et peut-être quant à leur nature intrinsèque.

ACTION DE LA TEMPÉRATURE.

La lipase du Ricin appartient au groupe des ferments qui ont besoin d'une certaine température pour agir. La température optima est voisine de 40°. On ne peut donner de chiffre exact sans préciser les conditions d'expérience ; en effet, la température exalte l'activité et détruit partiellement le ferment, aussi l'optimum de température varie avec le temps de l'expérience.

En suspension dans un mélange d'huile et d'eau, l'activité de la lipase disparaît à 60° (CONNSTEIN, HOYER et WARTENBERG). En revanche, le ferment conserve toutes ses propriétés à 100° dans l'huile, en l'absence d'eau (NICLOUX).

INFLUENCE DE L'ACIDITÉ DU MILIEU.

La lipase non activée agit en milieu acide. D'après JALANDER, l'acidité optima se trouve à environ $\text{pH} = 3$. En accord avec HALEY et LYMAN, WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ ont trouvé que l'acidité optima était à $\text{pH} = 4,5 - 7$. L'activité, d'après ces auteurs, est plus grande avec une solution tampon d'acétate, moindre avec une de phosphate et très faible avec une de citrate. ARMSTRONG et ORMEROD ont d'ailleurs montré qu'il n'y a aucune relation entre l'action d'activation des différents acides et leur constante de dissociation. HOYER était arrivé aux mêmes conclusions.

Il semble qu'il ne faille pas attacher beaucoup d'importance à la détermination du pH optimum. Tous les résultats fournis sur l'influence de l'acidité du milieu par les auteurs seraient intéressants à comparer si ceux-ci avaient opéré sur des produits identiques. L'hétérogénéité des produits explique leur désaccord sur des points importants — action de l'eau par exemple —. Il est bien difficile de comparer « la crème de ferment » de WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ à la « lipaséidine » de NICLOUX et au ferment activé de A. MOREL et L. VELLUZ. Cette difficulté est inhérente d'ailleurs à l'étude des ferments. On ne

peut comparer que des produits obtenus par des techniques rigoureusement identiques. M. GUILLEMET (20), étudiant le pH optimum d'hydrolyse des huiles par la lipase de Ricin, a montré combien il était illusoire de vouloir assigner un pH optimum rigoureux, alors que les substances protéiques accompagnatrices en changent la valeur avec chaque préparation.

Dans la littérature concernant la lipase, nous avons remarqué que les auteurs admettent que la lipase activée agit en milieu neutre. Cette opinion ne nous semble pas très exacte. En effet, la lipase activée mise en suspension dans l'eau, communique à celle-ci une réaction acide. Ne pourrait-on pas d'ailleurs expliquer l'activation du ferment par un acide comme une fixation de l'acide sur la micelle fermentaire ?

Cette remarque est d'ailleurs à rapprocher des observations de WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ. Ils ont montré qu'au cours de la germination l'optimum de réaction se déplace de l'acidité vers la neutralité. Les ferments protéolytiques de la graine s'attaquant à l'édifice colloïdal de la lipase, la modifient profondément. On a pu reproduire cette transformation de la lipase en la soumettant à un traitement par la pepsine ; on parvient ainsi à obtenir un ferment apte à travailler en zone neutre. La « Spermatolipase », qui se forme au cours de la germination, est plus stable, plus facile à conserver et d'un pouvoir de synthèse plus élevé que la « Blastolipase » des graines au repos. Seule l'insolubilité du ferment reste constante pendant cette transformation. Il est curieux de constater que le pH optimum tend vers la neutralité, alors que la graine s'acidifie.

ADJUVANTS ET PARALYSANTS.

WILLSTATTER a trouvé que le chlorure de sodium arrête toute activité. L'action inhibitrice serait en rapport avec la concentration du sel. De nombreux auteurs (51) ont signalé une exaltation par les sels de manganèse. D'après WILLSTATTER, l'addition de sel est sans action lorsque le pH est optimum. Pour CONNSTEIN, HOYER et WARTENBERG, l'ion fluor est un puissant agent paralysant, c'est d'ailleurs la règle générale pour tous les ferments. Les sels biliaires, grâce à leur pouvoir émulsionnant, sont de puissants adjuvants de l'action lipolytique du ferment de Ricin. La quinine, l'atoxyl sont sans action.

RAYON D'ACTION.

La lipase du Ricin est par excellence le ferment des graisses naturelles, qu'elle saponifie beaucoup plus énergiquement que ne le font les lipases animales. Comme la lipase pancréatique, elle saponifie plus aisément les triglycérides que les di et monoglycérides, mais inversement attaque plus difficilement les esters de poids moléculaires élevés. PIUTTI et DE CONNO (52) ont montré que pour l'hydrolyse des cires, des léci-thines et des phytines, les réactions étaient limitées. L'hydrolyse de ces derniers corps est particulièrement difficile.

Si l'on compare la saponification des graisses par les « Zooestérases » et les « Phytostérases », on est un peu surpris de voir ces dernières agir sous un

pH acide, alors que les ions OH sont des agents de saponification beaucoup plus actifs que les ions H. C'est encore une différence qui permet de supposer qu'à chaque lipase correspond une constitution particulière.

CHAPITRE IV

Analyse élémentaire du ferment saponifiant synthétisant de la graine de ricin

En général, les diastases élaborées par la cellule vivante passent aisément dans le milieu extérieur, il n'en va pas de même pour un certain nombre d'enzymes endocellulaires qui sont très intimement liées à la substance cytoplasmique. Cette solide liaison du ferment et du cytoplasme peut tenir à l'imperméabilité de la membrane cellulaire ; en détruisant celle-ci par digestion pepsique, on parvient à mettre le ferment en liberté. En d'autres cas, cette adhérence est de nature physico-chimique, et un traitement physique, trituration avec du sable siliceux, par exemple, permet de libérer le ferment. Enfin lorsque le support est de nature hydrocarboné, il faut avoir recours au ferment correspondant pour dégager le ferment de son enclave. C'est le cas de l'invertine, qui ne se répand dans le milieu extérieur qu'après l'action de la maltase.

Rien de semblable pour le ferment de Ricin. Si l'on veut en faire l'analyse on est obligé d'opérer sur le cytoplasme lui-même.

Pour nos analyses, nous avons employé le ferment activé. Le produit qui n'a pas subi le traitement par l'acide acétique décinormal ne diffère du premier que par des caractères secondaires. Il se présente sous l'aspect d'une poudre grisâtre beaucoup moins pulvérulente que le ferment activé. Il se met moins aisément en suspension dans l'eau. Enfin, l'addition d'acide acétique ou d'un tampon acétique est nécessaire pour que l'hydrolyse se produise.

A ces différences près, l'analyse nous a montré que la composition centésimale était la même.

ACTION DES RÉACTIFS ORDINAIRES.

Le réactif de MILLON colore la lipase en rouge brique

L'acide sulfurique, à froid, donne une coloration qui, du jaune vire au rose, puis au rouge violacé. A chaud, la réaction est beaucoup plus rapide, d'emblée la coloration finale est atteinte.

Insoluble dans l'acide chlorhydrique à froid, la lipase se dissout un peu dans ce réactif à chaud.

Elle est complètement soluble dans la soude normale froide.

Incinérée, elle laisse une certaine quantité de cendres, constituées surtout par des phosphates.

De toutes ces réactions, seule la réaction à l'acide sulfurique a attiré notre attention. En effet, doit-on attribuer beaucoup d'importance à la présence de cen-

dres ? Doit-on chercher dans les constituants des cendres le principe actif ? Il semble que non. Si l'on jette un regard sur les analyses des autres ferments on voit que les produits les plus purs contiennent encore des cendres, il y a même une élévation du taux des cendres avec le degré de pureté du produit. L'analyse récente de la sucrase, obtenue par adsorption et élution, révèle la présence de 4 % de cendres (EULER et JOSEPHSON). BARTH, dans une analyse antérieure du même ferment obtenu par les anciens procédés, ne signalait point la présence de cendres.

EULER et JOSEPHSON ont montré que la teneur en phosphore des cendres de la sucrase était proportionnelle à l'activité de celle-ci. Aussi ne faut-il peut-être point s'étonner de trouver des cendres dans la lipase purifiée et encore moins de rencontrer du phosphore, qui se trouve également dans un ferment très différent comme la sucrase.

Quant à vouloir localiser dans les constituants minéraux des cendres le principe actif, n'est-ce pas s'avancer un peu ? Les sels métalliques font-ils partie intégrante des micelles ou ne sont-ils que fixés superficiellement ?

ANALYSE DE LA LIPASE PURE « ACTIVÉE ».

Pour déterminer le carbone, nous avons eu recours à la méthode de NICLOUX, modifiée par BOIVIN (3). L'Azote a été évalué par Micro-Kjeldhal, et le Phosphore au moyen de la méthode de POSTERNAK (41).

Nous avons trouvé la composition centésimale suivante :

Echantillon I

CARBONE	=	45,80 p. 100.
AZOTE	=	7,64 p. 100.
PHOSPHORE	=	0,78 p. 100.

Echantillon II

CARBONE	=	43,20 p. 100.
AZOTE	=	7,14 p. 100.
PHOSPHORE	=	0,55 p. 100.

Ces résultats se rapprochent de ceux des auteurs allemands en ce qui concerne le carbone, mais s'en éloignent franchement pour les autres éléments.

WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ ont trouvé la composition suivante :

Analyse de la crème brute desséchée

CARBONE	=	50,75 p. 100.
AZOTE	=	15,51 p. 100.
PHOSPHORE	=	0,27 p. 100.

Analyse de la préparation purifiée

CARBONE	=	50,73 p. 100.
AZOTE	=	14,73 p. 100.
PHOSPHORE	=	1,21 p. 100.

Ces résultats discordants ne doivent pas étonner, les produits analysés étant extrêmement différents.

Peut-on comparer la « crème-enzyme brute », qui renferme des corps gras et des débris de parois cellulaires, à la préparation purifiée ?

Pour purifier la lipase extraite de la « crème-enzyme », ces auteurs ont eu recours à des mélanges alcalins ou acides. Ils sont parvenus à détacher du support colloïdal de l'enzyme quelques groupements protéiques, mais au préjudice de l'activité du ferment.

Ils reconnaissent d'ailleurs « qu'une purification « avancée, qui a pu dans un exemple, faire monter « la concentration enzymatique, peut être obtenue « par l'action des réactifs aqueux dissolvants des albumines. Telles les solutions suivantes :

« Carbonate de soude à 0 gr. 7 p. 100 ; Potasse à « 0 gr. 50 p. 100; Acide chlorhydrique à 0 gr. 5 p. 100. »

On comprend aisément qu'une analyse portant sur un produit ainsi traité peut varier d'un échantillon à l'autre.

L'analyse élémentaire, qui fait penser à la composition centésimale de beaucoup d'albumines, n'éclaircit point la constitution du ferment.

*
* *

Notre attention a toujours été attirée par le pouvoir émulsionnant très grand du ferment de la graine de Ricin. Cette remarque, faite d'ailleurs par d'autres auteurs, en particulier par J. LEMARCHANDS (30), nous a conduit à rechercher si le cytoplasme ne renfermerait pas un corps du groupe des Saponines.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons porté à l'ébullition pendant une demi-heure, dans un appareil

muni d'un réfrigérant à reflux, 1 gramme de cytoplasme mis en suspension dans 100 cm³ d'acide chlorhydrique normal.

50 cm³ de ce liquide, centrifugés pour éliminer les parties non dissoutes, ont été neutralisés avec de la lessive de soude diluée au dixième.

Le liquide neutralisé était doué de pouvoir réducteur et un dosage pratiqué selon la méthode de Bertrand nous a révélé la présence d'un sucre réducteur, qui, exprimé en glucose, atteignait 7 p. 100 de la prise d'essai.

Ce corps réducteur donnait après purification une osazone présentant les caractères de solubilité et le point de fusion de la glucosazone.

Les points de fusion, pris au Bloc de Maquenne pour trois osazones provenant d'échantillons différents, ont été respectivement :

ECHANTILLON A : F = 228°.

— B : F = 231°.

— C : F = 232°.

Outre le point de fusion, ces osazones s'identifiaient à la glucosazone par leur insolubilité dans l'eau, dans l'alcool méthylique et dans l'acétone étendue de son volume d'eau.

De cette expérience on peut conclure que l'hydrolyse acide détache du cytoplasme un sucre réducteur présentant les caractères analytiques du glucose.

Nous avons pris soin d'opérer sur un produit pur. Toutes les filtrations furent pratiquées sur filtre poreux d'Iéna, pour éliminer la cause d'erreur qu'entraînerait la présence de papier dans le produit.

Les 50 cm³ mis à part et provenant de l'hydrolyse acide ont été, après centrifugation, placés dans une ampoule à décantation et agités à plusieurs reprises avec de l'éther. Après décantation du liquide acide, l'éther a été lavé à l'eau distillée. Enfin, la solution étherée a été mise à évaporer dans une capsule où elle a abandonné un résidu qui a été repris par l'alcool absolu.

Après évaporation de l'alcool, on a obtenu un résidu à peu près incolore donnant avec l'acide sulfurique une coloration rose virant au rouge violet. A chaud, la teinte finale était immédiatement atteinte.

Ce résidu a été dissous dans le chloroforme, auquel on a ajouté moitié de son volume d'acide sulfurique, après agitation avec la solution chloroformique l'acide s'est coloré en rouge.

La réaction de LIBERMANN pratiquée sur le résidu a été peu intense.

Le résidu dissous dans l'alcool n'a pas précipité au contact d'une solution alcoolique de digitonine.

Les particules du cytoplasme non attaquées et qui ont été éliminées par centrifugation donnaient encore au contact de l'acide sulfurique concentré une coloration rose virant au rouge violacé.

L'hydrolyse acide a donc libéré un sucre et un stérol.

En présence de ces résultats nous nous sommes demandé si le stérol que l'on obtenait n'était point le stérol inclus dans le cytoplasme et aisément labile.

Pour vérifier ce point, nous avons épuisé, pendant huit heures au Kumagawa, par l'alcool absolu, une

prise d'essai de cytoplasme voisine de 1 gramme. L'alcool évaporé a abandonné un faible résidu, noirissant au contact de l'acide sulfurique. Ce résidu était constitué par des acides gras. En revanche, le cytoplasme soumis à ce traitement donnait encore une coloration rouge en présence de l'acide sulfurique concentré.

Ces essais nous permettent de conclure à la présence d'un corps du groupe des saponines, très solidement lié au cytoplasme.

*
*
*

Nous avons ensuite tenté de séparer ce corps de son support protéique. Nous avons opéré de la façon suivante :

1 gr. de cytoplasme était dissous dans 50 cm³ de soude normale froide. Après centrifugation pour éliminer les parcelles insolubles, la solution ainsi obtenue était acidulée par l'acide acétique dilué au dixième. On laissait au repos 24 heures. On avait, d'une part une liqueur légèrement acide, d'autre part un précipité protéique.

La liqueur acide, neutralisée, puis acidifiée par l'acide chlorhydrique, a été soumise à une hydrolyse d'une demi-heure. Nous avons décelé dans le liquide d'hydrolyse des traces de stérol.

Le précipité de nucléoprotéides soumis également à l'hydrolyse acide a fourni un liquide contenant un stérol et un sucre identifiable au glucose.

Cette expérience prouve combien le composé de nature glucosidique adhère au substratum protéique.

D'après ces expériences, on peut supposer que le cytoplasme retient très énergiquement un composé de nature glucosidique s'apparentant par ses réactions aux corps du groupe des saponines.

La présence d'une saponine dans le ferment du Ricin n'implique pas que le même corps existe chez les autres Phytoestérases ; en effet, le pouvoir émulsionnant de la lipase de la graine de Ricin ne se rencontre qu'à un degré bien moindre chez les autres lipases.

Nous avons observé, en accord avec M. LEMARCHANDS, que la lipase de la graine de Soleil (*Helianthus annuus*) est douée d'un pouvoir émulsionnant bien moindre, ce qui a d'ailleurs pour corollaire une action saponifiante plus faible. Tous les auteurs sont unanimes à accorder à la lipase de la graine de Ricin un pouvoir émulsionnant et saponifiant bien supérieur à celle des autres graines. Il semble logique d'attribuer cette différence à la présence de cette saponine.

Dans l'action hydrolysante du ferment de Ricin, doit-on considérer cette saponine comme l'agent causal ou bien comme un adjuvant ? Il semble difficile de se prononcer tant est grande l'adhérence de ce composé aux éléments protéiques qui l'accompagnent.

Conclusions

Continuant les recherches antérieures de Maurice NICLOUX, et de Albert MOREL et LÉON VELLUZ, sur l'extraction et la détermination de la nature du ferment saponifiant-synthétisant de la graine de Ricin, nous avons pu établir les points suivants :

I. — Il est possible, en employant pour la séparation par différence de densité du cytoplasme d'avec les autres constituants de la graine décortiquée l'acétate d'éthyle, d'obtenir un cytoplasme rigoureusement exempt de grains d'aleurone.

II. — Le cytoplasme ainsi obtenu par centrifugation au sein de ce liquide, activé par contact avec l'acide acétique décinormal pendant vingt minutes à 37°, possède une haute activité fermentaire réversible (saponification-synthèse).

III. — Le ferment ainsi activé soumis à la micro-analyse organique volumétrique renferme :

en Carbone, de	43,2 à 45,8	p. 100
en Azote, de	7,14 à 7,64	p. 100
en Phosphore, de ..	0,55 à 0,78	p. 100

suivant les échantillons et leur état de dessiccation, et donne les réactions générales des protides.

IV. — Après dissolution dans la soude normale froide, filtration sur filtre en verre poreux, de façon à ce que soient éliminées toutes parcelles de cellulose, il donne par précipitation à l'acide acétique un coagulum, qui semble contenir une proportion importante de *sucre réducteur* (probablement, d'après l'étude faite, de la phénylosazone), du glucose ; un *stérol* caractérisé seulement par la coloration rouge donnée par l'acide sulfurique et une *protide*.

Si ces constatations se confirmaient sur de nombreuses préparations de ferment saponifiant-synthétisant de la graine de Ricin, que nous n'avons pas encore eu le temps d'obtenir, et si elles se complétaient par celle d'un pouvoir hémolysant, elles permettraient de concevoir cet agent comme résultant de la conjugaison d'une saponine et d'une protide rendant la première insoluble par fixation sur la seconde.

Vu :
LE DOYEN,
JEAN LEPINE.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
MOREL.

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 18 Janvier 1932.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. LIRONDELLE

Bibliographie

1. ARMSTRONG et GOSNEY. — Studies on enzyme action. *Proceed of Royal Soc. (B.)*, 1913, t. 86, p. 586 ; 1915, t. 88, p. 176.
2. ARMSTRONG et ORMEROD. — *Proced. of Roy. Soc. (B.)*, 1905, t. 76, p. 606.
3. BOIVIN. — Conférence sur dosage d'azote par des tractions sulfuriques des matières organiques. (*Bull. Soc. Chim.*, B. 10, déc. 1929).
4. BERTHELOT (M.). — Mémoire sur la combinaison de la glycérine avec les acides, et sur la synthèse des principes immédiats des graisses des animaux. (*Ann. Chim. et Phys.*, 1854, 3^e série, t. XLI, 21)6.
5. BERGZELLER. — *Bioch. Zeitschr.*, 1911, t. 31, p. 170.
6. BOURNOT. — *Biochem. Zeitschr.*, 1913, t. 52, p. 172.
7. BRADLEZ. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1910, t. 8, p. 251.
8. CHEVREUL. — Recherches sur les corps gras d'origine animale, Paris, 1823.
9. CONNSTEIN HOYER et WARTENBERG. — *Ber. Chem. Ges.*, 1902, 3989.
10. DUNLAP et SEYMOUR. — *Journ. of Amer. See. Chem. Soc.*, 1905, t. 27, p. 935.
11. EULER. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1905, t. 45, p. 420.
12. FABRE (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1925, t. 5, pp. 432-448.
13. FABRE (R.). — L'adsorption en biologie, la Médecine, N° 12, 1930.
14. FALK. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1915, t. 37, p. 649.

15. FALK et NELSON. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, t. 37, pp. 735-828.
16. FOKIN. — *Chem. Zentr.*, 1903, t. 74, II, p. 1451 ; 1904, t. 75, II, p. 1617.
17. GREEN. — *Proced. of Roy. Soc.*, 1890, 370.
18. GREEN et JACKSON. — *Proced. of Roy. Soc.*, 1905, 69.
19. GUILLEMET (R.). — Sur le pouvoir lipolytique de différentes variété de graines de ricin ; facteurs susceptibles de le modifier. (*C. R. Soc. Biol.*, 34, t. CVIII, p. 779, 1931).
20. GUILLEMET (R.). — Sur le photimum d'hydrolyse des huiles végétales par la lipase de la graine de ricin. (*C. R. Soc. Biol.*, 34, t. CVIII, p. 781, 1931).
21. HALEY (P.-E.) et LYMAN (J.-F.). — *Ass. Chem. Soc.*, 1921, t. 12, 2664-2670.
22. HANSIK. — *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1909, t. I, p. 54.
23. HOYER. — *Chem. Zentb.*, 1905, t. 76, p. 582.
FALK et HAMLIN. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1913, t. 35, p. 210.
FALK. — *Proced. Nat. Acad. Sc.*, 1915, t. I, p. 136.
24. HOYER. — *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1907, t. 50, p. 414.
25. ISCOVESCO. — *Biochem. Zeitschr.*, 1910, t. 24, pp. 53-78.
26. IWANOW. — *Bericht. der deutsch. botan. Gesel.*, 1911, t. 29, p. 585.
27. JALANDER. — *Biochem. Zeitschr.*, 1911, t. 31, p. 159.
28. KASTLE et LOEWENHARDT. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1912, t. 24, p. 491.
29. KRAUSS. — *Zeits. angew. Chem.*, 1911, t. 24, p. 385.
30. LEMARCHANDS (J.). — Contribution à l'étude des transformations et spécialement de la saponification des réserves graves dans les graines au cours de la germination (*Th. Doct. ès-Sc.*, Lyon, 1929).
31. LOEW. — *Biochem. Zeitschr.*, 1911, t. 31, p. 159.
32. LUMIA, MALYS et JAHRESBER. — *Über des Fortschr. d. Tierchemie*, 1898, XXVII, p. 724.

33. MAILLOT (Ed.). — Etude comparée du pignon et du ricin de l'Inde (*Thèse Pharmacie Nancy*, 1880).
34. MASTBAUM. — *Chem. Zentr.*, 1907, t. 78, I, p. 978.
35. MICHAELIS (A.) et EHRENREICH (M.). — L'analyse des diastases par adsorption (*Biochem. Zeitschr.*, 1908, t. 10, pp. 283-299).
36. MOREL (A.) et VELLUZ (L.). — Contribution à l'étude de la synthèse biochimique des glycérides. Sur la réversibilité diastomique du cytoplasme de la graine de ricin (*C. R. Ac. Sc.*, 1928, t. CXXXVI, p. 43).
37. MUNTZ. — *Ann. Chim. Phys.*, 1881, t. 22, p. 472.
38. MICLOUX (M.). — Contribution à l'étude de la saponification des corps gras (*Th. Doct. ès-Sc.*, 1906).
39. PELOUZE (J.). — Mémoire sur la saponification des huiles sous l'influence des matières qui les accompagnent dans les graines (*C. R. Ac. Sc.*, 1855, t. XI, pp. 605-611, et *Ann. Chim. Phys.*, 1855, t. LXLV, pp. 319-327).
40. PIUTTI (A.) et DE CONNO (E.). — Sur l'action hydrolytique de la lipase du ricin (*Annali Chim. Applic.*, 1928, t. 18, pp. 468-478).
41. POSTERNAK. — Dosage du phosphore (*Bull. Soc. Chim.*, 1920, t. XXVII, pp. 507-518 et 564-568).
42. POTTEVIN. — *C. R. Ac. Sc.*, 1903, t. I, 36, p. 1152; 1904, t. I, 37, p. 138.
43. SIGMUND. — *Monatsch. für Chem.*, 1890, p. 272.
44. SOMMERVILLE. — *Bioch. Journ.*, 1912, t. 6, p. 203.
45. TANAKA. — *Journ. of College of Sc. and Eng. Tokio*, 1910, t. 5, p. 25 ; 1912, t. 5, p. 125.
46. TAYLOR. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1906, t. 2, p. 89.
47. TAYLOR. — *Univ. California, publ. Path.*, 1, 33.
48. TONEGUTTI. — *Chem. Zentr.*, 1911, t. 8, p. 332.
49. TRAETTAMOSCA (F.) et MILETTI (F.). — La lipase des graines de soleil (*Helianthus annuus*) (*Annali Chim. applic.*, 1923, t. 13, pp. 270-288).

50. URBAIN, PERRUCHON et LANGON. — *C. R. Ac. Sc.*, 1904, t. 606, p. 139.
 51. URBAIN, SAUGON et FEIGE. — *Bull. Soc. Chim.*, 1904, t. 31, p. 1194.
 52. VISSER. — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1905, t. 52, p. 257.
 53. WELTER. — *Zeitschr. für anorg. Chem.*, 1911, t. 21, p. 385.
 54. WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ. — Über Ricinus lipase (*Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1924, t. 134, p. 161).
 55. WILLSTATTER, WALDSCHMIDT-LEITZ et HESS (A. R. F.) — *Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1925, t. 34, p. 142.
-

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	13
PLAN SUIVI DANS CE TRAVAIL	15
CHAPITRE I ^{er} . — Historique	17
CHAPITRE II. — Etude critique des différentes méthodes de préparation du ferment	23
CHAPITRE III. — Propriétés de la lipase de la graine de ricin	43
CHAPITRE IV. — Analyse élémentaire du ferment saponi- fiant synthétisant de la graine de ricin.....	49
CONCLUSIONS	59
BIBLIOGRAPHIE	61



BOSC FRÈRES, M. & L. RIOU

00 00 IMPRIMEURS-ÉDITEURS 00 00

42, QUAI GAILLETON, 42 00

00 00 00 00 LYON 00 00 00 00



